植保會刊 28：213～223 (1986)
Plant Prot. Bull. (Taiwan, R.O.C.) 28：213～223 (1986)

臺灣十字花科蔬菜黃葉病菌特性之研究

羅朝村[1]　　孫守恭[2]

1. 臺灣省農業試驗所植病系　2. 國立中興大學植病系

（接受日期：民國75年4月7日）

摘　　要

近年來本省各地十字花科蔬菜，逐漸被黃葉病危害且有蔓延的趨勢，嚴重者甚至已達廢耕地步。自蘿蔔、芥菜、芥藍病株分離出之病菌 FOR_{0611}、FOM_{0227}、FOK_{1105} 各菌株，經接種十六種十字花科作物，發現 FOM_{0227}、FOK_{1105} 寄主範圍較 FOR_{0611} 爲廣，幾乎可感染各種十字花科蔬菜。三菌株對其寄主均有強而專一致病力。其生理、生化特性彼此間亦有差異，尤其蛋白質種類含量，經垂直平板電泳法分析，FOR_{0611} 之蛋白質帶與 FOM_{0227}、FOK_{1105} 者相異；但與來自西柏林蘿蔔黃葉病菌株 (G_{62045}) 蛋白質帶相似。因此可確定臺灣十字花科黃葉病至少有兩種菌系，即 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*（或 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 2）和 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*（或 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 1）。

（關鍵字：蘿蔔、芥菜、芥藍、黃葉病。）

ABSTRACT

Chaur-Tsuen Lo[1] and Shou-Kung Sun[2] (1986) **Characterization of *Fusarium oxysporum* Isolated from Cruciferous Vegetable in Taiwan.** Plant Prot. Bull. (Taiwan, R. O. C.) 28：213～223 (1. Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute 2. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University)

Fusarium oxysporum (Schl.) Snyder et Hansen, the causal organism of cruciferae yellows, was readily isolated from discolored vascular tissue of radish (isolate FOR_{0611}), Mustard (isolate FOM_{0227}), and Kale (isolate FOK_{1105}). Artificial inoculations to sixteen kinds of cruciferous vegetables with infested soil in greenhouse indicated that host range of FOM_{0227} and FOK_{1105} were wider than that of FOR_{0611}., but each isolate showed a highly specific pathogenicity on its own host. This is indicative that physiological or pathological specialization already existed in *F. oxysporum* (Schl.) attacking cruciferous vegetables in Taiwan.

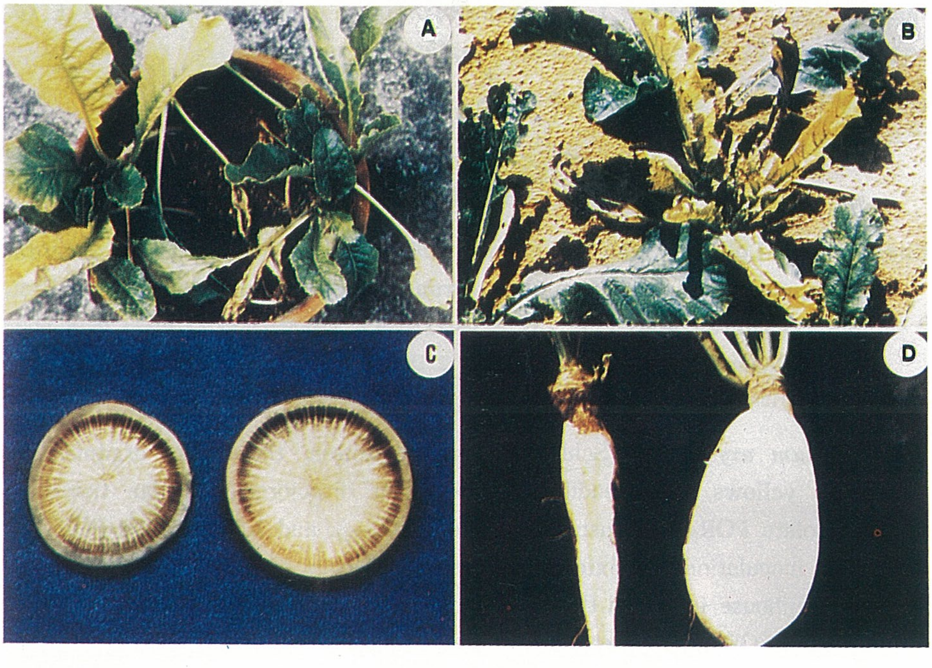
Physiological and biochemical studies also showed that growth of FOM_{0227}

and FOK_{1105} were different from FOR_{0611} in temperature, carbon and nitrogen source. Soluble protein pattern of radish isolates (FOR) was different from that of FOM_{0227} and FOM_{1105} in vertical slab gel electrophoresis, but was almost identical to G_{62045}, an isolate of radish yellows from West Germany. From above studies we could assume that at least two biological (or physiological) forms existed under *F. oxysporum* attacking cruciferous vegetables in Taiwan. They were *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (or *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 1) and *F. oxysporum* f. sp. *raphani* (or *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 2).

(Keywords: Radish, Mustard, Kale, *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, *F. oxysporum* f. sp. *raphani*.)

前　　言

十字花科蔬菜一向是本省重要而大宗的蔬菜[3]，近年來由於需求量大增，經營方式已逐漸趨向企業化與專業化，其病害除根瘤病(*Plasmodiophora brassicae*)有顯著增加外[14]，黃葉病的危害也有蔓延的趨勢，嚴重者幾已達廢耕的地步[7]。不論田間自然發病或温室接種；十字花科蔬菜(如芥菜、芥藍、蘿蔔等)祇要被十字花科黃葉病菌(*Fusarium oxysporum*)所侵害[10,16,17]，在幼苗期子葉黃化，植株枯萎死亡；至成株期之病徵爲由下位葉到上位葉快速黃化，葉片倒捲，植株矮化，剖開根部維管束則呈現褐化及木栓化現象，根部硬化，停止發育(圖一)，可說已成爲十字花科蔬菜重要之病害。



圖一、*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* 爲害蘿蔔所引起，病徵(A：接種病徵，B：田間病徵，C：橫切面，D：縱切面)。

Fig. 1. Symptom of Fusarial yellows of radish. (A: Inoculated plants, B: Field specimens, C: Cross section of a diseased plant, D: Longitudinal section of a diseased (left) and a healthy (right) plant).

由於十字花科蔬菜之黃葉病在臺灣直到最近才被發現[6]，國內幾無資料可供參考。加上黃葉病菌之寄主範圍廣[9,10,20]，實難單憑分離，接種而判定爲何種菌系。故擬從芥藍、芥菜、蘿蔔等病株分離出之病原菌，從事其病原性及生理、生化特性之研究比較，藉以瞭解本省十字花科黃葉病之病原菌是單一菌系或如國外報導之多元菌系[9]。

材料與方法

供試菌株之來源：

自新社、埔里、新竹、桃園、大里等地區分別採取蘿蔔、芥菜、芥藍黃葉病病株根部，經1％之次氯酸鈉（NaOCl）溶液消毒三分鐘後，以 PCNB 選擇性培養基[4,19]，及水瓊脂（Water agar），分離得 FOR_{0611}、FOR_{0729}、FOR_{1122} 等（來自蘿蔔）、FOM（來自芥菜）、FOK（來自芥藍）等菌株，依 Kock 氏法則確定病原性後，選定病原性較強 FOR_{0611}、FOR_{0729}、FOR_{1122}、FOM_{0227}、FOK_{1105} 及 G_{62045}[11,12]（西柏林 Dr. Gerlach 供給之蘿蔔黃葉病菌株）等菌株作本研究之菌源。

病土的製造：

把 FOR_{0611}、FOM_{0227}、FOK_{1105} 菌株培養於消毒後的芹菜切莖中，經一星期取出與砂質壤土（砂土：坋土：黏土＝52.8：35：12.2 W/W），有機質 1.02％，pH 值 6.4）均勻拌合，二十天後以 20 mesh 的網篩篩過裝於 $45 \times 33 \times 33\ cm^3$ 的塑膠盆中，作爲供試的病土源。

溫度對各菌株菌絲生長之影響比較：

於Czapek's平板上，將FOR_{0611}、FOM_{0227}、FOK_{1105} 單胞挑置於平板中央，分別置於 8、12、16、20、24、28、32 及 36°C 等定溫箱中，每處理五重複，六天後量取菌落最寬兩處直徑，求其平均值。

碳、氮源對各菌株菌絲生長的影響比較

取 Glucose, Xylose, Fructose, Sucrose, Galactose, Maltose, Lactose, Starch, Cellulose 等碳水化合物，以相當於20g葡萄糖之含碳量。及$NaNO_2$, $NaNO_3$, Urea, Glutamic acid, Aspartic acid, Arginine, Methionine, Alanine, Histidine, Glycine, Asparagine 等氮素源，以相當於 2g $NaNO_3$ 之含氮量，分別取代 Czapek's solution 中之 Sucrose 和 $NaNO_3$，不加碳或氮源者爲對照，消毒滅菌後，將供試菌株之單胞挑入培養液中，五重複，於室溫下培養二週，測其乾重量[2]。

不同培養基上酵素的測定比較：

將FOR_{0611}、FOR_{1122}、FOR_{0729}、FOM_{0227}、FOK_{1105} 菌株之單胞，分別接種於 Hankin 酵素測定培養基上[2,13]測定澱粉、果膠、蛋白質、脂肪、尿素等分解酵素之產生與否。

蛋白質的電泳分析比較：

將 FOR_{0611}, FOR_{1122}, FOR_{0729}, G_{62045}., FOM_{0227}, FOK_{1105} 振盪培養於 Czapek's solution 中，二星期後，以抽氣漏斗將大部分胞子去除，留下菌絲，依 Widson 方法[2,21]萃取蛋白質後，利用 7.5％ Polyacrylamide 做成之板狀式膠體電泳法（Vertical slab gel electrophoresis）分離蛋白質帶[1,5,21]，以觀察各菌株之差異性。

黃葉病菌對十字花科蔬菜病原性比較：

將蘿蔔〔（矸仔、大梅花、大白杙品種）鳳試所贈〕，高峰甘藍、花椰菜、青花菜，不結球白菜（小白菜、青梗白菜、青江白菜、黃金白菜），黑芥藍、白芥藍、油菜、濱綠白菜（購于農友公司）、芥菜、榨菜（桃園改良場贈）等16種十字花科蔬菜各25棵，各別種於含有 3×10^3 propagules/g. soil 之 FOR_{0611}、FOM_{0227}、FOK_{1105} 菌株病圃中，經二個月後，調查其發病率，病害調查法仿照日本奈良試驗場西瓜蔓割病率換算公式[7]。

結果

菌落形態及胞子大小：

由試驗結果發現各菌株均具有大小兩種分生胞子及厚膜胞子，各種胞子之大小範圍均爲典型的 *Fusarium oxysporum*。其中各菌株小胞子、厚膜胞子無明顯差異，但可明顯看出 FOM_{0227}、FOK_{1105} 之大胞子均較蘿蔔菌株（FOR_{0611}）爲大（表一），在 PDA 培養基上 FOR_{0611} 菌落呈深紫色，幾無胞子堆（Sporodochia）。FOM_{0227}、FOK_{1105} 菌落則呈粉紅色

至淡紫色及有明顯的胞子堆（圖二）。

表 一、*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*（蘿蔔）及 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*（芥菜和芥藍）之胞子形態

Table 1. Characteristics of spores of *Fusarium oxysporum* f. sp. raphani (from Radish) and *F. oxysporum.* f. sp. *conglutinans* (from Mustard and Kale)

	F. oxysporum f. sp *raphani*	*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*	
	FOR_{0611}	FOM_{0227}	FOK_{1105}
Locality of collection	Shui-Ching	Chin-Chui Ru-Chui	Taichung
Time of collection	1981-6-11	1982-2-27	1981-11-05
Plant part for isolation	Root	Root	Root
Size of spore (um)			
Macroconidium	18.2×3.8 (12.3-33.2×3.1-5.4)	32.8×4.2 (17.5-57.5×2.3-5.0)	34.0×11.5 (25.6-41.9×3.5-4.7)
Microconidium	9.3×3.0 (6.2-15.0×2.5-5.0)	8.2×2.8 (4.7-14.0×2.3-3.5)	6.5×2.6 (3.5-9.3×1.9-3.5)
Chlamydospore	9.4×9.4 (5.0-15.0×5.0-15.0)	11.28×11.28 (7.0-14.0×7.0-14.0)	6.5×6.4 (3.5-9.3×3.5-9.3)

Size of spore was an average of 100 spores.

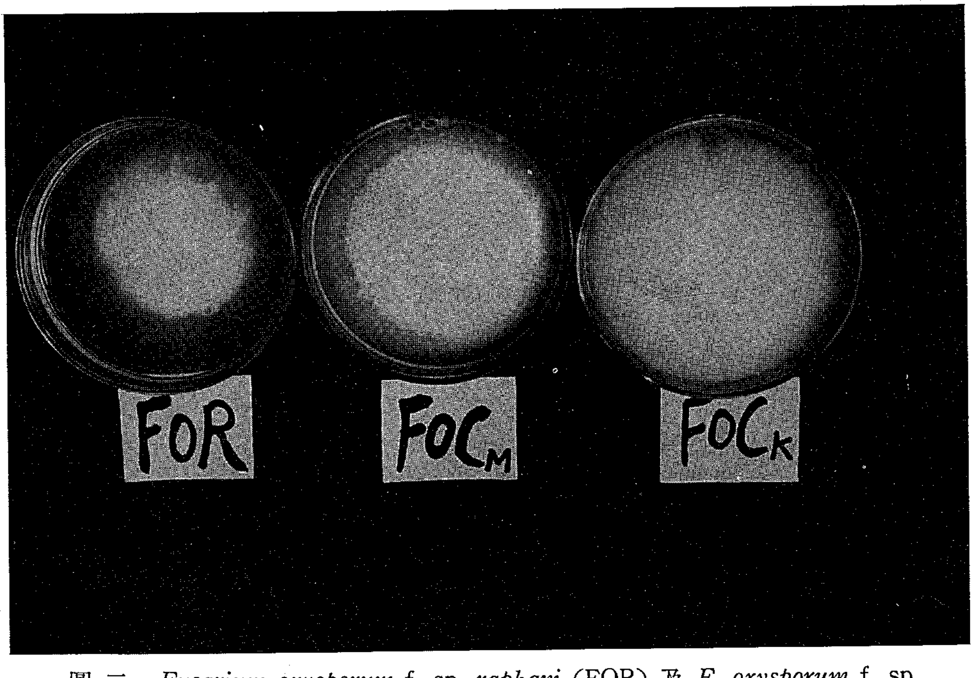


圖 二、*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* (FOR) 及 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (FOC_M 和 FOC_K) 在 PDA 培養基上的菌落形態。

Fig. 2. Colonial morphology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* (FOR) and *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (FOC_M and FOC_K) on PDA.

溫度對各菌株菌絲生長之影響比較

FOM_{0227} 及 FOK_{1105} 生長範圍（12～36 °C）較 FOR_{0611} (8～36°C) 爲窄（圖三），FOR_{0611} 最適溫度爲 24°C 而 FOM_{0227} 及 FOK_{1105} 則以 28°C 最適生長。

碳素源對各菌株菌絲生長的比較：

FOR_{0611} 以 Starch, Xylose 最利生長，FOM_{0227} 以 Starch, Fructose 生長最佳，而 Starch, Sucrose 則最適 FOK_{1105} 生長（圖四）。

氮素源對各菌株菌絲生長的比較：

FOR_{0611} 以 Histidine, Asparagine 最適生長，FOM_{0227} 以 $NaNO_2$, Glycine 生長最佳，而 $NaNO_2$, Histidine 則較適合於 FOK_{1105} 之生長（圖五）。

不同培養基上酵素測定比較

各菌株均能分泌澱粉、蛋白質、尿素、脂肪及果膠分解酵素，但其酵素活性在不同菌株間則有差異（表二）。

各菌株蛋白質成份之電泳分析：

Polyacrylamide gel 電泳分析顯示蘿蔔各菌株均與西德之 G_{62045} 相似，至於芥菜及芥藍與蘿蔔菌株則有明顯的蛋白質帶差異（圖六）。

各菌株在十字花科蔬菜病原性比較試驗：

來自蘿蔔（FOR_{0611}），芥菜（FOM_{0227}）及芥藍（FOK_{1105}）之三菌株，對本身寄主皆有較高之病原性。三者皆可廣泛危害測定之十字花科作物，但危害程度則以 FOM_{0227} 爲最強（表三）。

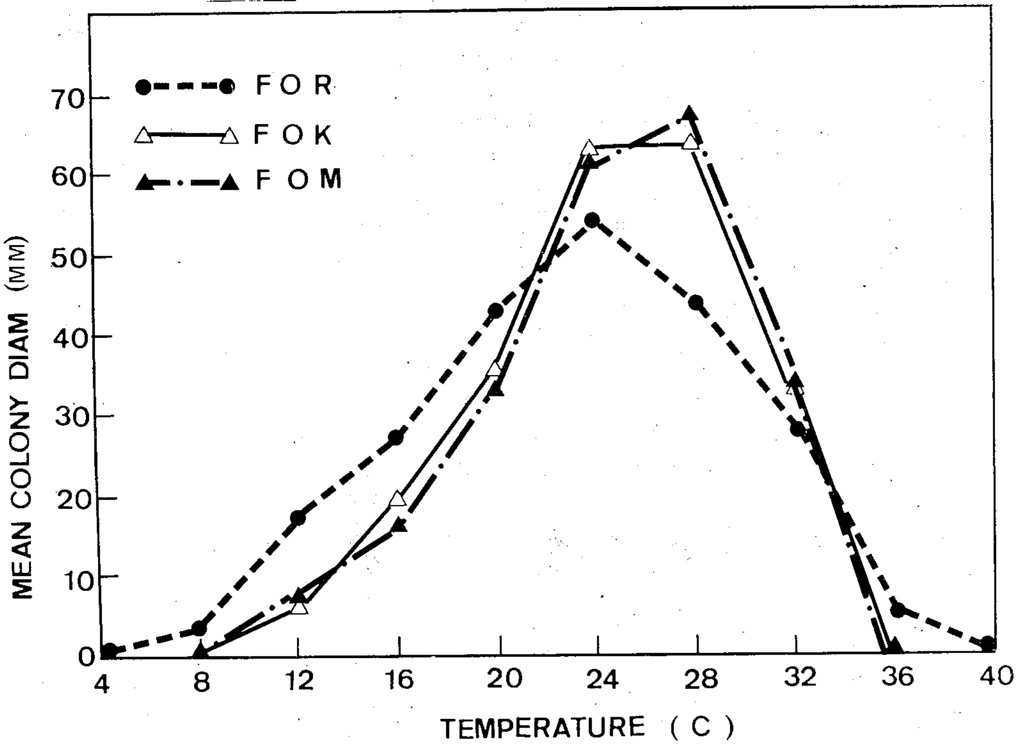
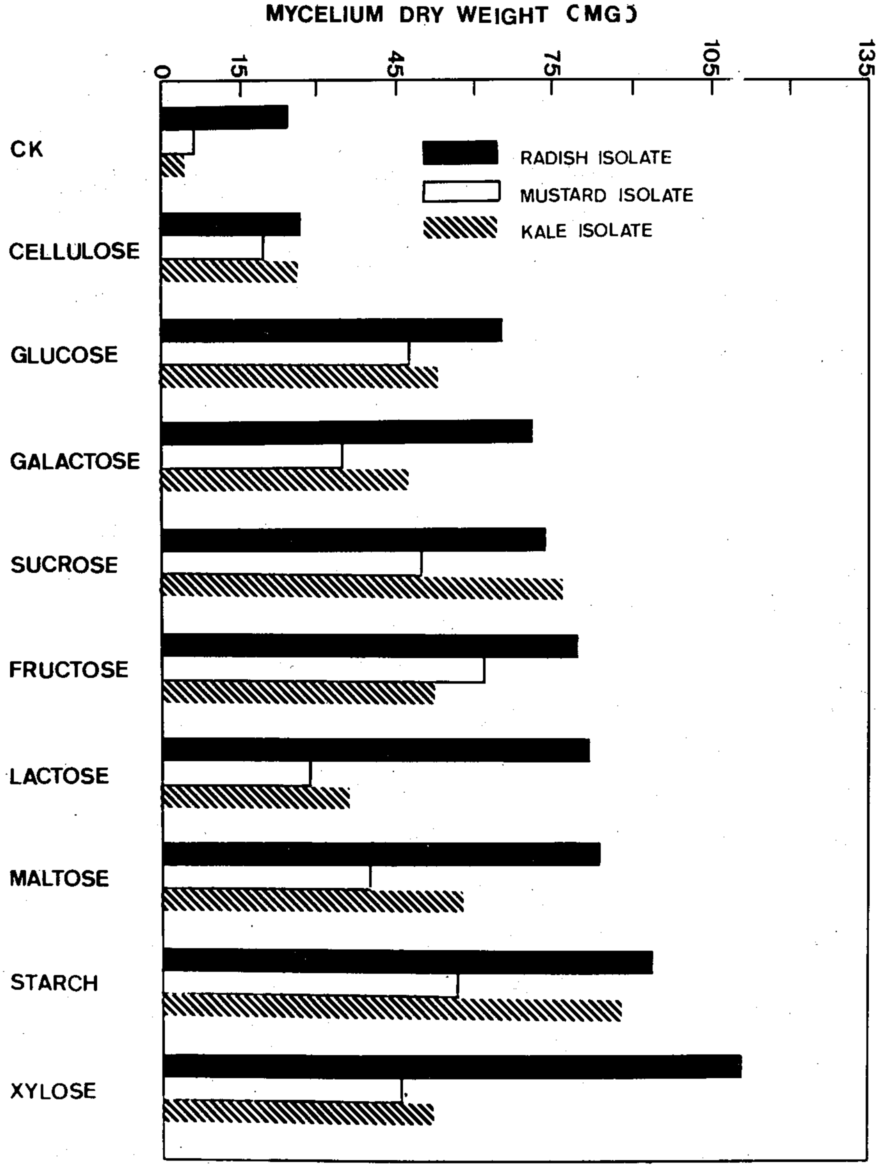


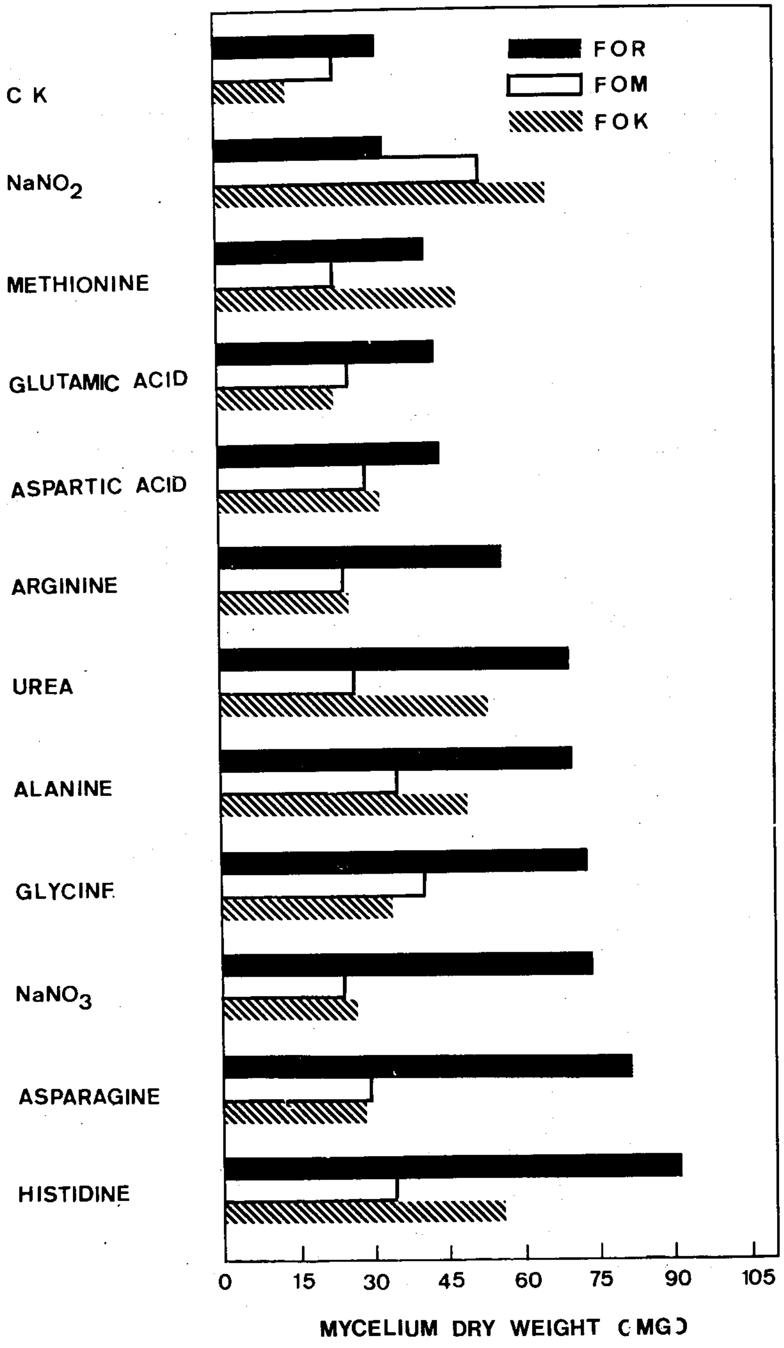
圖 三、溫度對 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* 及 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 菌絲生長之影響。

Fig. 3. Effect of temperature on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* (FOR) and *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (isolates from Kale (FOK) and Mustard (FOM)).



圖四、*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* 及 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 對碳素源之利用。

Fig. 4. Effect of various carbon compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* (FOR) and *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (FOK and FOM).



圖五、*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* 及 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 對氮素源之利用。

Fig. 5. Effect of various nitrogen compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* (FOR) and *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (isolates from Kale (FOK) and Mustard (FOM)).

表 二、*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* 及 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 在固體培養基上產生酵素之比較

Table 2. Enzyme production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* (FOR), and *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (FOK and FOM) on solid media.

Enzyme detected	*F. oxysporum* f. sp. *raphani*			*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*	
	FOR_{0611}	FOR_{0729}	FOR_{1122}	FOM_{0227}	FOK_{1105}
Amylase	+	+	+	+	+
Lipase	+++	+++	+++	+	+
Protease	+	+	+	+	+
Polygalacturonase	+	+	+	+	+
Pectate lyase	+	+	+	+	+
Urease	++	++	+++	++	+

+++: Indicating enzymatic activity most active.

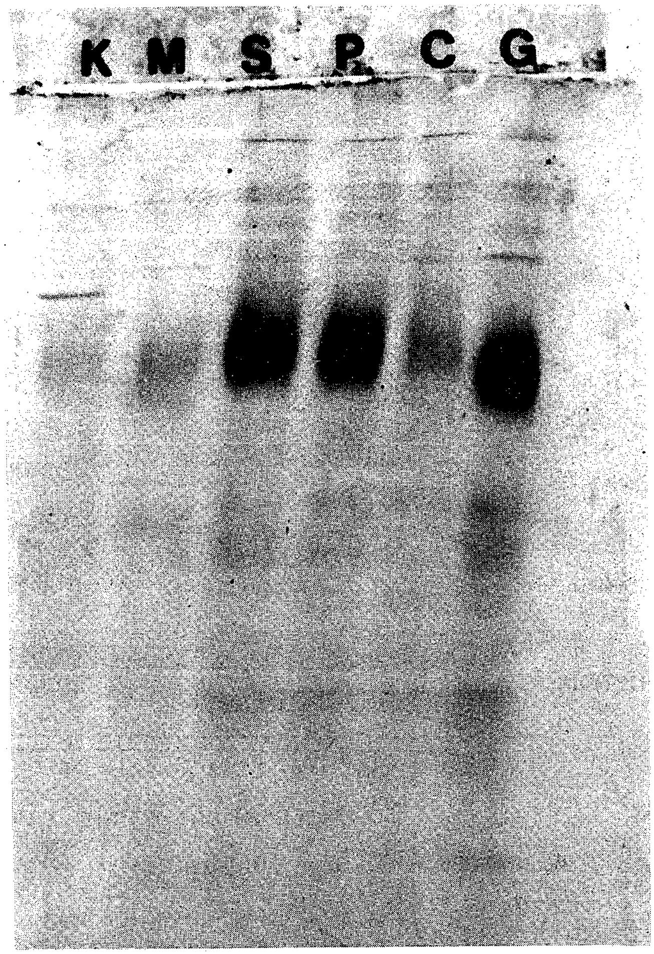


圖 六、*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* 及 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 之蛋白質電泳分析圖。

Fig. 6. Protein pattern of FOK(K), FOM(M), FOR(=S, P, C) and G62045 assayed by polyacrylamide gel electrophoresis.

表 三、*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* 和 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 之病原性比較

Table 3. Pathogenicity test of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* and *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (isolated from Kale and Mustard) on cruciferous vegetables

Cruciferous vegetable	Percentage of disease		
	FOR	FOM	FOK
Radish (蘿蔔)			
Kan (矸仔)	100	32	32
Chin (大白杙)	100	40	28
Ta-May-Hwa (大梅花)	92	16	16
Cabbage(Kau-feng) (甘藍)	8	24	24
Small Pai-Tsai (不結球白菜)			
Pai-Tsai (小白菜)	8	48	8
Green-Petiole Pai-Tsai (青梗白菜)	0	20	8
Ching-Chiang Pai-Tsai (青江白菜)	4	16	12
Gold Pai-Tsai (黃金白菜)	4	20	16
Kale (芥藍)			
White Kale (白芥藍)	0	0	20
Black kale (黑芥藍)	0	8	20
Cauliflower (花椰菜)	28	40	40
Broccoli (青花菜)	4	4	24
Chinese cabbage (Bin-Ru) (結球白菜)	0	8	20
Rapeseed (紅油菜)	4	12	8
Mustard (芥菜)	20	88	8
Tsatsai (榨菜)	44	76	8

討 論

有關十字花科蔬菜黃葉病菌的病原性或寄主範圍，Snyder[20]曾將感染紫蘿蘭花 (Garden stock)，甘藍 (Cabbage)，蘿蔔 (Radish) 之菌株交互接種 (Cross inoculation) ，發現在接種寄主中，或多或少可被感染，但對於本身寄主皆表現出相當高而專一的致病力，因此認爲上述三菌株爲不同生物型 (Biological form) 乃區分成不同分化型 (formae speciales)。爾後 Armstrong[8]將上述三菌株分別接種於多種十字花科植物上，發現三菌株之寄主範圍有相互重疊現象，意即多種蔬菜類及觀賞植物均可被三菌株感染。因而認爲三者具有某些相同基因 ，而將三者合併成 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* 下分三個生理小種 (Physiological race): race 1 (cabbage isolate), race 2 (Radish isolate), race 3 (Garden stock isolate)，後來又由 Garden stock 中又另分出一個菌系爲 race 4[9]。

由於黃葉病是本省新發現之病害，加之上述菌株寄主範圍廣泛，因此爲利於爾後之研究，確認是何種菌系所引起，實乃是當務之急。經筆者從事病原性比較蘿蔔、芥菜、芥藍三菌株之試驗結果(表三)發現 FOR_{0611} 及 FOM_{0227} 對本身寄主有高而專一的病原性 ，因此依照

Snyder 分類法[20]，可區分成兩種不同分化型。若依寄主範圍及相關性[9]，FOM_{0227}、FOK_{1105} 亦可與 FOR_{0611} 區分成兩種不同的生理小種。

1980年Madhosingh[18]利用養分需求，電泳分析蛋白質、代謝產物等可區分 *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* race 1 與 race 2。高氏等[15]亦由菌絲可溶性蛋白質的電泳分析可鑑定疫病菌類。因此筆者亦以生理、生化特性比較三菌株之相異性。發現在溫度（圖三），碳、氮源需求（圖四、圖五）可約略將 FOK_{1105}、FOM_{0227} 與 FOR_{0611} 區分，同時在可溶性蛋白質電泳分析（圖六）不但可發現 FOR_{0611} 等蘿蔔菌株與來至西德之 G_{62045} 蘿蔔菌株相似，更可看出 FOR_{0611} 與 FOM_{0227}、FOK_{1105} 蛋白質帶相異。因此吾人可確定目前臺灣的十字花科蔬菜黃葉病菌株至少有兩個分化型，即 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*〔或 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 1）與 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*（或 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 2）。

引 用 文 獻

1. 吳金洌。1976。*Polyacrylamide* 膠體電泳之新發展。生物科學之介紹(三)。生物研究中心專刊，第七號：28-32。
2. 余淑美。1979。不同寄主之來源*Fusarium moniliforme* 之生物學比較研究，國立中興大學植物病理研究所第八屆碩士論文 pp. 57。
3. 施名南、陳國雄、張義弘。1980。臺灣蔬菜名錄。農林廳種苗改良繁殖場編印。pp. 111。
4. 孫守恭。1975。Fusarium 屬病原菌在土壤中之生態，植保會刊 17:216-232。
5. 黃檀溪。1975。Polyacrylamide gel 在生物學上的應用，生物科學新技術之介紹。生物研究中心專刊第5號(2):1-8。
6. 羅朝村、孫守恭、黃振文。1981。蘿蔔黃葉病研究初報。植保會刊 23:279（摘要）
7. 羅朝村。1983。蘿蔔黃葉病菌之生理、生態研究及防治試驗，國立中興大學植物研究所，第十三屆碩士論文 pp. 102。
8. Armstrong, G. M., and J. K. Armstrong. 1952. Physiological race of the Fusaria causing wilts of the cruciferae. Phytopathology 42:255-257.
9. Armstrong, G. M., and J. K. Armstrong. 1966. Race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*; race 4, new race; and a new host for race 1, *Lychnis chalcedonica*. Phytopathology 56:525-530.
10. Baker, K. F. 1948. Fusarium wilt of garden stock (*Mathiola incana*). Phytopathology 38:399-403.
11. Gerlach, W. 1975. Der erete von fusarium-welke an levkojen in Deutsch land, Nachrichtenbl, Dtsch pflanzenschutzd (Braunschweig) 27:17-20.
12. Gerlach, W., and E. Leiber. 1976. Erstes Aufterten der Fusarium-welke an Rettich in Deutschland. Phytopath. Z. 87:193-204.
13. Hankin, L., and S. L. Anagostakis. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67:590-607.
14. Hsieh, W. H., and C. H. Yang. 1985. Investigations on the clubroot and the susceptibility of crucifers in Taiwan. Plant Prot. Bull. (Taiwan, R.O.C.) 27:3-10.
15. Kao, C. W., H. Masago, and L. S. Leu. 1982. Identification of Phytophthora species by disc electrophoresis. Plant Prot. Bull. (Taiwan, R.O.C.) 24:193-200.
16. Kendrick, J. B., and W. C. Snyder. 1936. A vascular fusarium disease of radish. Phytopathology 26:98.
17. Kendrick, J. B., and W. C. Snyder. 1942. Fusarium wilt of radish. Phytopathology 32:1031-1033.

18. Madhosingh, C. 1980. *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* A: Biochemical comparison of race 1 and race 2. Phytopathology Z. 98:27-39.

19. Nash, S. M., and W. C. Snyder. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot Fusarium in field soils. Phytopathology 52:567-572.

20. Snyder, W. C. 1949. Cross inoculations with vascular fusaria of stock, cabbage and radish. Phytopathology 39:863.

21. Widson, J. D., and W. M. Ingledew. 1982. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amylolytic enzyme. Appl. and Environ. Microbiol. 44:301-307.